

兔纤维环损伤椎间盘退变模型观察 神经长入的实验研究

辛 龙, 韩国灿, 赵凤东, 赵 兴, 李 钢, 范顺武
(浙江大学医学院 附属邵逸夫医院骨科, 浙江 杭州 310016)

[摘 要] **目的:**用2种不同方法损伤纤维环诱发椎间盘退变,观察椎间盘退变及神经纤维长入退变间盘的病理过程。**方法:**分别用11号刀片(刀片损伤组)和16号针刺(针刺组)5 mm深度损伤纤维环,致髓核突出椎间盘退变;在不同时间点采用X线、MRI和组织学方法进行椎间盘退变的评价,免疫组化方法PGP 9.5和GAP 43特异性神经抗体染色观察退变椎间盘神经纤维长入的过程。**结果:**与正常对照组相比,刀片损伤组和针刺组术后2周,受损椎间盘高度和T2信号强度开始逐渐下降($P < 0.01$),与此同时其组织结构也发生退变,其中刀片损伤组椎间盘退变过程和程度较针刺组快。术后12周纤维环损伤处髓核突出瘢痕组织形成。免疫组化:正常椎间盘仅在纤维环最外层有神经纤维分布且与纤维环相平行;刀片损伤组瘢痕组织表面及深部散在分布神经纤维,深度 >1 mm;针刺组仅在瘢痕组织外层及浅部区域有神经纤维分布,且刀片损伤组较针刺组有更广泛的神经长入。**结论:**5 mm深度11号刀片损伤、16号针刺兔纤维环退变模型在损伤后发生一种进展的逐渐退变过程,而且刀片损伤纤维环退变快,神经纤维分布广而深。这种进展的病理过程可能与源性腰痛密切相关。

[关键词] 椎间盘/病理学; 腰椎/病理学; 疾病模型, 动物; 神经纤维; 腰痛

[中图分类号] R 681.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1008-9292(2009)05-0485-08

In vivo study of innervation of degenerative intervertebral discs in rabbit anular-injury model

XIN Long, HAN Guo-can, ZHAO Feng-dong, ZHAO Xing, LI Gang, FAN Shun-wu (Department of Orthopedics, The Affiliated Sir Run Run Shaw Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310016, China)

[Abstract] **Objective:** To observe degenerative intervertebral disc and to examine innervation of degenerative discs in the rabbit anular-injury model. **Methods:** Two different magnitudes of anular injury at 5 mm depth were performed by 11 blade or 16 gauge needle at the L3-L4 or L5-L6 discs in New Zealand white rabbits ($n=48$, 2.5-3.0 kg). Disc degeneration was evaluated by radiographic, MRI and histological examination at different time points after surgery. To identify nerve ingrowth into disc, two general markers PGP 9.5 and GAP 43, for nerve fibers were examined by immunohistochemistry. **Results:** Significant decreases in disc height and signal

收稿日期: 2008-12-23 修回日期: 2009-08-17

基金项目: 浙江省科技厅重点资助项目(2006C23029)。

作者简介: 辛 龙(1973—), 男, 博士, 研究方向为椎间盘退变及下腰痛相关疾病; E-mail: xinlonghz@hotmail.com.cn.

通讯作者: 范顺武(1963—), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事脊柱外科专业; E-mail: fansw@srrsh.com.

intensity in magnetic resonance imaging were observed in 11 blade group and 16 G puncture group ($P < 0.01$). 16 G puncture group induced slower and more progressive disc degeneration companed with the stab group and control group. At the 12-week time point, nucleus pulposus tissues were extruded and scar tissues formed outside the disc. In stab discs, nerve ingrowth was scattered on the surface of injury site and in the deeper part of the scar tissues, more than 1 mm from the surface. However, in punctured discs, PGP 9.5 and GAP 43-immunoreactive fibers were only observed in the outmost part of the scar tissues and superficial area. More nerve fibers were observed in stab group. **Conclusion:** Innervation may act as a source of discogenic pain which is associated with intervertebral disc degeneration caused by disc anular injury.

[Key words] Intervertebral disk/pathol; Lumbar vertebrae/pathol; Disease models, animal; Nerve fibers; Low back pain

[J Zhejiang Univ (Medical Sci), 2009,38(5):485-492.]

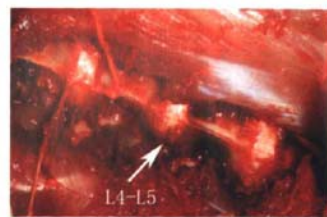
慢性下腰痛发病率高,治疗花费大,已成为一个重要的社会经济问题^[1]。通常认为椎间盘自身病变是导致慢性下腰痛的主要原因,但其确切机制仍不清楚。正常椎间盘只有纤维环最外层存在神经纤维,髓核中心无神经分布^[2-5]。近年来,某些研究发现部分椎间盘源性腰痛患者的椎间盘内有自外向内延伸的神经纤维长入,深及纤维环内1/3及髓核^[6-8];而且发现纤维环周围损伤在源性下腰痛中起很重要的作用^[9]。纤维环损伤后,肉芽组织长入退变椎间盘,而这种新生肉芽组织常伴有神经长入,显然,这种神经长入可能与源性腰痛的发生密切相关^[10]。

一些动物体内研究表明纤维环损伤直接诱发椎间盘退变,但损伤后愈合能力较差^[11-12]。纤维环损伤诱发椎间盘退变过程是否伴有神经纤维长入研究较少。为了明确退变椎间盘与神经长入的相关性,本实验选用不同方法损伤兔椎间盘纤维环致髓核突出而发生退变,采用特异性神经抗体染色观察退变椎间盘神经纤维长入的病理过程,从而为临床上解释盘源性腰痛的发病机制提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 动物实验与分组 雄性新西兰大白兔48只,体重 (2.5 ± 0.5) kg,年龄12个月左右,由浙江大学医学动物中心提供。腹腔注射3%戊巴比

妥钠(30 mg/kg),麻醉起效后,右侧卧位四肢固定。术区剪毛后碘伏消毒,左侧后腹膜入路显露L2—L6椎间盘节段。切口从12肋下致髂嵴上缘,长约6 cm,依次切开各层组织,向前推开后腹膜及脂肪组织,钝性分离椎旁束带状腰大肌,显露3个连续的椎体前缘L2/3至L5/6(图1)。髂嵴水平线为L5/6椎间盘的定位标记。L3/4和L5/6椎间盘作为实验间盘,L4/5椎间盘作为对照间盘。选择16号针刺(针刺组),11号刀片(刀片损伤组)损伤椎体左前侧纤维环(9点位置),限制损伤深度5 mm,朝向椎间盘中心,损伤后持续留置5 s,术后逐层缝合创口。连续3 d肌注青霉素(20万U/d),预防感染。术后将动物随机分为2、4、8、12周4个模型组,每组12只,放回笼内观察,常规饲养。



箭头所示L4/5椎间隙。

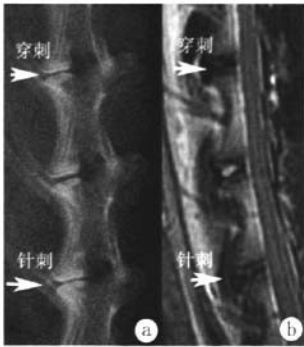
图1 术中显露椎体前侧3个连续的椎间盘(L3—L6)

Fig.1 Three continuous discs (L3-L6) were exposed in surgery

1.2 影像学检查

1.2.1 椎间盘高度X线摄片 术后2、4、8、12周时间点,每组随机抽取12只,3%戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔麻醉起效后,采用Philips 数字X线摄片机(条件参数:60 kV、3.2 mAs)腰椎侧位X线摄片(图2a)。摄片时避免脊柱轴位旋转,可将兔侧卧位固定于兔盒中,投照中心定于髂嵴上4 cm。

1.2.2 MRI 术后2、4、8、12周,每组随机抽取12只,采用1.5 T GE 磁共振扫描机进行MRI 检查。保持麻醉状态,仰卧放置肢体线圈磁场中,腰椎部位于线圈中心。T2 相冠状位扫描定位L1—L6 椎间盘,正中矢状位扫描观察术后退变的T2 信号(图2b)。T2 序列检查参数:TR 3 500 ms、TE 100 ms、层厚 2 mm、视野 12×9、矩阵320×256。根据Thompson 分级,T2 信号强度变化分为1—4 级。一级:正常;二级:轻度减弱且高信号区域明显缩小;三级:中度减弱;四级:严重减弱(图3)。



a 为X线摄片:11号刀片损伤L3/4 间隙,16号针刺L5/6 间隙,L4/5 作为对照;b 为MRI:刀片损伤L3/4 间隙,16号针刺L5/6 间隙(箭头所示)。

图2 术后腰椎侧位X线和MRI

Fig. 2 Lateral radiograph and T2-weighted MRI of rabbit lumbar spine were taken after annular injury

1.2.3 图像分析 安装Image-Pro plus 软件对存储的X线图像进行分析,计算机画板上测量术后不同时间点的椎间盘和椎体高度。根

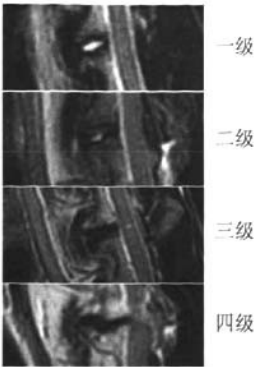
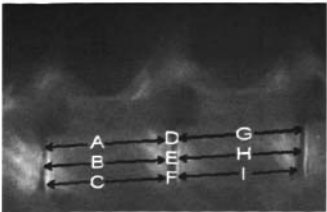


图3 根据Thompson 分级观察T2 信号强度变化

Fig. 3 Thompson classification used to assess the severity of disc degeneration using T2-weighted MRI

据An 等^[13]研究方法以椎间盘高度指数(disc high index,DHI)来描述椎间隙变化,测量椎间盘前、中、后平均高度除以相邻两椎体高度, $DHI=2\times(D+E+F)/(A+B+C+G+H+I)$ (图4)。用DHI 百分比来评估椎间盘高度的变化, $DHI\text{ 百分比}=\text{术后DHI}/\text{术前DHI}$ 。MRI 分级由2 位资深影像科医师双盲法进行评估,阅片者事前不知道研究目的、手术过程,以及术前或术后图像。



D、E、F 指前、中、后椎间盘的高度,A、B、C、G、H、I 指相邻椎体的高度。

图4 Image-Pro plus 软件分析测量椎间盘高度变化

Fig. 4 Using digitized radiographs, intervertebral disc height was analyzed by Image-Pro plus software

1.3 组织学检查 术后 2、4、8、12 周,腹腔注射过量 3%戊巴比妥钠(30 mg/kg)将兔处死,完整截取腰椎 L3—L6,并进行大体观察和拍照。然后,将带有终板和薄层椎体的退变椎间盘放置 10%中性福尔马林,室温固定 48 h,10% EDTA 脱钙 4~6 周。石蜡包埋,6 μ m 厚组织切片,HE 和免疫组化染色后 Nikon 光学显微镜下观察髓核,纤维环和突出瘢痕组织病理改变(放大倍数 40 $\times$ ~400 $\times$)。

1.4 免疫组化法观察神经长入 神经特异性抗体 GAP 43(growth associated protein 43)和 PGP 9.5(protein gene product 9.5)两步法免疫组化染色。一抗:鼠抗大鼠单克隆抗体 GAP 43(Life span,USA),兔抗人多克隆抗体 PGP 9.5(AbD serotec,UK);二抗选用通用型 EnVision™ 试剂盒(Dako,Carpinteria,CA)。组织切片脱蜡水化后,10%小牛血清和 3%过氧化氢分别封闭非特异性抗原位点和内源性过氧化物酶。煮沸加热修复抗原,暴露抗原位点;滴加一抗,4℃孵育过夜,PBS 冲洗后滴加二抗,37℃放置 20 min;DAB 显色;苏木素复染 30 s 后常规透明封片。阴性对照片用正常小牛血清替代一抗。镜下出现棕黄色颗粒为阳性表达。仔细观察退变间盘及瘢痕组织内有无阳性表达神经纤维,评价神经纤维长入组织的深度。

1.5 统计学处理 实验数据应用 SPSS 10.0 统计软件处理。实验结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,不同组在不同时间点椎间盘高度指数百分比的变化采用单因素方差分析(One-way ANOVA)进行统计分析,SNK 法进行组间两两比较。磁共振分

级评分采用双向有序行列表 χ^2 检验,多组多次比较用 Bonferroni 方法进行校正。 $P<0.05$ 为统计学有显著性意义。

2 结果

2.1 术后纤维环退变椎间盘高度和磁共振变化 与对照组比较,刀片损伤组和针刺组术后 2 周内椎间盘高度指数下降显著,以后不同时间点降低趋势明显($P<0.01$);与针刺组比较,刀片损伤组椎间盘高度指数明显降低($P<0.01$),结果见表 1。Thompson 分级观察椎间盘正中矢状位 T2 信号强度变化,造模时间越长,受损椎间盘髓核信号强度降低越明显,出现“dark disc”。刀片损伤组、针刺组磁共振指数高于对照组,差异有统计学意义($P<0.01$)。刀片损伤组磁共振指数高于针刺组,两者比较有显著差异($P<0.05$),见表 2。

2.2 组织学观察 大体观察正常椎间盘纤维环和髓核分界清晰,外层白色纤维环完整,呈层状同心排列,中央髓核组织呈胶冻样(图 5a)。损伤纤维环后,髓核组织突出,损伤处形成瘢痕组织(图 5b)。正常椎间盘组织切片(HE 染色)为排列整齐的层状胶原纤维构成特征性纤维环,髓核组织观察到一些大的,凹空样脊索细胞和少量略小卵圆形的类软骨样细胞(图 6a-b);术后 12 周,纤维环排列紊乱,纤维软骨化明显,裂隙处髓核突出,形成的瘢痕组织表面散在分布一些小血管和疏松结缔组织(图 6c),髓核内未见脊索细胞,以排列紊乱的纤维软骨细胞替代,髓核明显纤维化(图 6d)。

表 1 术后椎间盘高度指数的变化

Table 1 The percent disc height index of discs changes after injury

(n=12, $\bar{x}\pm s$)				
组 别	2 周	4 周	8 周	12 周
对照组	97.52 $\pm$ 0.81**	97.94 $\pm$ 0.62**	96.60 $\pm$ 1.05**	97.03 $\pm$ 0.66**
针刺组	89.29 $\pm$ 0.65**	86.15 $\pm$ 0.75**	84.02 $\pm$ 1.65**	82.48 $\pm$ 1.09**
刀片损伤组	81.77 $\pm$ 1.27	77.30 $\pm$ 0.69	76.64 $\pm$ 1.86	75.83 $\pm$ 1.04
F 值	553.15	1795.89	335.06	1036.78
P 值	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

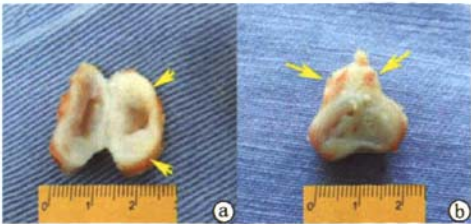
与刀片损伤组和针刺组比较,** $P<0.01$;与刀片损伤组比较,** $P<0.01$ 。

表2 椎间盘T2 信号强度MRI 分级指数的比较

Table 2 The MRI grade of the puncture group and the stab group changes at 4 and 12 weeks

组 别	MRI 分级				平均秩次
	1	2	3	4	
4 周					
对照组	12	0	0	0	8.50
针刺组	3	6	2	1	20.00 ^{△△}
刀片损伤组	1	2	6	3	27.00 ^{* **}
12 周					
对照组	12	0	0	0	7.00
针刺组	1	4	4	3	21.29 ^{△△}
刀片损伤组	0	1	4	7	27.21 ^{* **}

与对照组比较,****P*<0.01;与针刺组比较,**P*<0.05;与对照组比较,△△*P*<0.01。

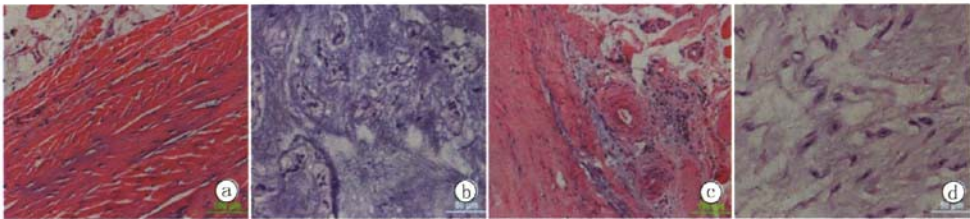


a:术前,黄色箭头所示纤维环的最外层;b:术后12周,黄色箭头所示在损伤处形成的瘢痕组织。

图5 兔椎间盘大体观察

Fig. 5 Macroscopic observation of disc before and after surgery

2.3 针刺椎间盘突出瘢痕组织形成和神经长入观察 正常对照组椎间盘仅在纤维环最外层观察有GAP 43 染色阳性神经纤维分布,且与层状纤维环平行;椎间盘外围椎旁肌肉间隙与



a:正常组纤维环可见排列整齐的层状胶原纤维(×200);b:正常组髓核内可见大的凹空样脊索细胞和一些小类软骨细胞(×400);c:12周后损伤组纤维环失去层状结构,软骨化明显,髓核突出形成瘢痕组织,表面散在分布一些血管(×200);d:损伤组髓核内未见脊索细胞,以排列紊乱的纤维软骨细胞替代(×400)。

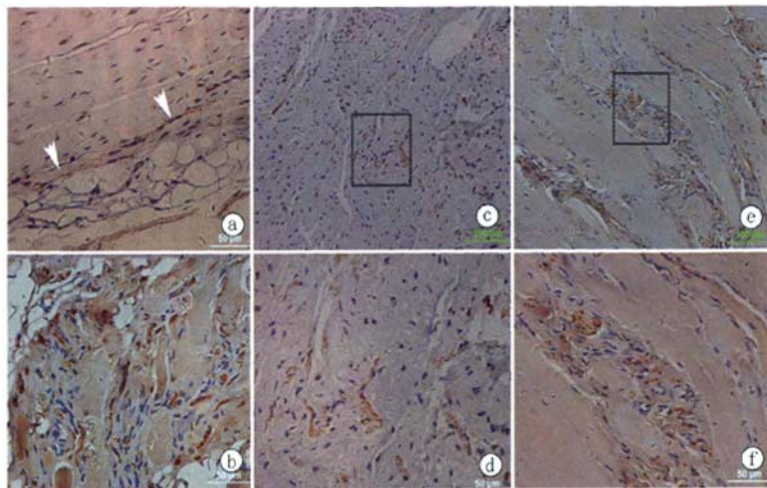
图6 正常组和损伤组HE 染色观察结果

Fig. 6 Hematoxylin and eosin stain in different groups

疏松结缔组织中也有较多PGP 9.5 染色阳性神经纤维分布(图7a-b)。在刀片损伤组瘢痕组织表面及内部观察到广泛散在分布的GAP 43 染色阳性神经纤维,深度超过1 mm(图7c-d)。针刺组瘢痕组织表面有PGP 9.5 染色阳性神经纤维分布,浅部也发现有阳性表达神经纤维(图7e-f)。仔细观察刀片损伤组与针刺组退变椎间盘内层纤维环、髓核内部都没有发现神经纤维。在同一视野下(×200)观察阳性表达神经纤维数目,刀片损伤组神经纤维分布明显多于针刺组,但在术后4周、12周变化无显著差异。

3 讨论

在体研究椎间盘退变疾病,选择合适的动物建立疾病模型非常重要。好的动物模型应具备以下几方面:①动物易获取且经济;②有合适大小的椎间盘进行手术操作;③客观模拟椎间盘退变,且过程相对缓慢;④结果可靠,可重复性强。因此,通常选用兔作为研究对象来观察椎间盘退变病理过程。纤维环损伤是被认为在诱发椎间盘退变过程中起重要作用,而破坏纤维环是其中最广泛应用的一种外科干预方法^[14]。



a:正常椎间盘GAP 43染色阳性的神经纤维分布于纤维环的最外层,与层状纤维环相平行(箭头所示,×400);b:PGP 9.5染色阳性神经纤维广泛分布于纤维环外肌肉间隙(×400)。c:刀片损伤组GAP 43染色阳性神经纤维散在分布于瘢痕组织深部(深度>1 mm,×200);d:放大倍数(×400)。e:针刺组瘢痕组织浅部有PGP 9.5染色阳性神经纤维分布;f:放大倍数(×400)。

图7 各组GAP 43和PGP 9.5表达

Fig. 7 Growth associated protein43, protein gene product 9. 5 expression in different groups

Lipson 和Muir 等^[15]利用11号刀片穿刺破坏纤维环研究椎间盘退变过程。刀片损伤纤维环后导致大量髓核组织急性突出,短时间内椎间隙发生纤维软骨化,椎间盘退变过程相对过快。近来研究利用不同型号针刺破坏纤维环诱发退变,模仿一种进展缓慢逐渐退变的过程^[16-17]。Masuda^[18]等利用针刺兔模型,在退变椎间盘注射生长因子OP-1来观察退变的椎间隙高度变化,获得可靠实验结果。虽然这些方法都模拟了椎间盘退变病理过程,但纤维环损伤后一系列退变过程中是否伴有神经长入研究较少。因此,本研究采用11号刀片、16号针刺损伤纤维环来观察不同程度损伤纤维环后是否有神经纤维长入退变椎间盘,退变椎间盘是否一定是“痛性椎间盘”。研究结果表明这2种损伤方法对退变过程都产生直接影响,发现纤维环破坏后,髓核突出形成瘢痕组织,瘢痕组织表面及深部分布有神经纤维,而正常椎间盘只有最外层纤维环分布有神经纤维。研究结果证实纤维环损伤诱导椎间盘退变过程往往伴有神经纤维长入瘢痕组

织,而髓核及纤维环内层并没有神经长入。而且刀片损伤组较针刺组有更广泛的神经纤维分布,程度较明显。这说明纤维环损伤退变的椎间盘模型确能观察到神经纤维长入,损伤程度直接影响神经长入,这为进一步研究退变椎间盘或盘源性腰痛产生的病理机制提供线索。

一旦退变椎间盘中存在痛觉感受器,在机械、化学刺激下就会产生腰痛症状,本研究提示退变椎间盘内神经长入系盘源性腰痛的主要发病原因。Aoki 等^[19]报道鼠椎间盘神经长入的神经元,半数以上是受体神经元,这些神经纤维末梢属于疼痛受体,传递痛觉。本实验选用神经抗体GAP 43,这是一种生长相关蛋白,在神经轴突生长和引导神经生长锥中起重要作用^[20];而PGP 9.5是一种神经元特异性蛋白,对于所有类型神经纤维,包括运动神经元轴突都有表达。尽管这2种神经抗体都显示退变椎间盘瘢痕组织内有神经纤维长入,但本实验无法分析这些神经纤维的具体特性,并不能排除瘢痕组织内可能存在一些与痛觉无关的神经纤维。因

此,今后有必要深入研究这些神经纤维是否是受体神经元以传递痛觉。

影响神经长入退变椎间盘因素错综复杂。我们在以前临床研究中,发现多数的盘源性腰痛患者在行椎间盘造影时,疼痛复制常与纤维环破裂同时存在,这提示纤维环的破裂可能为神经纤维的长入提供了可能,从而诱发疼痛的发生^[9]。目前研究认为椎间盘内聚糖减少和炎性反应与神经纤维长入退变椎间盘密切相关。Melrose 等^[21]在椎间盘退变羊模型中研究发现,椎间盘内蛋白聚糖成分影响神经纤维长入。而Aoki 等^[22]研究发现,炎性反应潜在刺激神经轴突长入鼠退变椎间盘。本研究注意到刀片损伤组纤维环退变过程较针刺组更快,神经长入深度更深且范围较广。这可能由于刀片损伤纤维后造成裂隙较宽,椎间盘内基质成分相应流失较多,使神经更易长入;而在针刺纤维环后,胶冻样髓核组织顺着针口充满通道,可能抑制神经纤维生长,仅在瘢痕组织表面。因此,神经长入的确切病理机制还需进一步研究。

综上所述,不同方法损伤纤维环诱发椎间盘退变,退变过程中常伴有神经长入突出瘢痕组织深部,而在纤维环内层及髓核没有观察到神经长入。纤维环损伤程度影响神经长入的分布,这些长入的神经纤维可能成为疼痛源,与源性腰痛密切相关。

References:

- [1] ANDERSSON G B. Epidemiological features of chronic low back pain [J]. *Lancet*, 1999, 354: 581-585.
- [2] BOGDUK N, TYNAN W, WILSON AS. The nerve supply to the human lumbar intervertebral disc [J]. *J Anat*, 1981, 132: 39-56.
- [3] KONTTINEN Y T, GRONBLAD M, ANTTI-POIKA I, et al. Neuroimmunohistochemical analysis of peridiscal nociceptive neural elements [J]. *Spine*, 1990, 15: 383-386.
- [4] ROBERTS S, EISENSTEIN S M, MENAGE J, et al. Mechanoreceptors in intervertebral disc: morphology, distribution and neuropeptides [J]. *Spine*, 1995, 20: 2645-2651.
- [5] PALMGREN T, GRONBLAD M, VIRRI J, et al. An immunohistochemical study of nerve structures in the annulus fibrosus of human normal lumbar intervertebral discs [J]. *Spine*, 1999, 24: 2075-2079.
- [6] COPPES M H, MARANI E, THOMEER R T, et al. Innervation of annulus fibrosis in low back pain [J]. *Lancet*, 1990, 336: 189-190.
- [7] COPPES M H, MARANI E, THOMEER R T, et al. Innervation of "painful" lumbar discs [J]. *Spine*, 1997, 22: 2342-2349.
- [8] FREEMON A J, PEACOCK T E, GOUPILLE P, et al. Nerve ingrowth into diseased intervertebral disc in chronic back pain [J]. *Lancet*, 1997, 350: 178-181.
- [9] ZHAO Feng-dong, HUANG Yue, FAN Shun-wu, et al (赵凤东, 黄悦, 范顺武, 等). The correlation between the lumbar vertebral endplate modic degeneration and degeneration of lumbar intervertebral disc or pain provocation observed on CT discography [J]. *Chinese Journal of Orthopaedics* (中华骨科杂志), 2006, 26(1): 30-34. (in Chinese)
- [10] PENG B, WU W, HOU S, et al. The pathogenesis of discogenic low back pain [J]. *J Bone Joint Surg Br*, 2005, 87: 62-67.
- [11] OSTI O L, VEMON-ROBERTS B, FRASER R D. 1990 Volvo Award in experimental studies. Annulus tears and intervertebral disc degeneration; an experimental study using an animal model [J]. *Spine*, 1990, 15: 762-767.
- [12] KANERVA A, KOMMONEN B, GRONBLAD M, et al. Inflammatory cells in experimental intervertebral disc injury [J]. *Spine*, 1997, 22: 2711-2715.
- [13] AN H S, TAKEGAMI K, KAMADA H, et al. Intradiscal administration of osteogenic protein-1 increases intervertebral disc height and proteoglycan content in the nucleus pulposus in normal adolescent rabbits [J]. *Spine*, 2005, 30: 25-31.
- [14] ALINI M, EISENSTEIN S M, ITO K, et al. Are animal models useful for studying human disc disorders/degeneration? [J]. *Eur Spine J*, 2008, 17: 2-19.
- [15] LIPSON S J, MUIR H. 1980 Volvo award in basic science: proteoglycans in experimental

- intervertebral disc degeneration [J]. *Spine*, 1981,6:194-210.
- [16] MASUDA K, AOTA Y, MUEHLEMAN C, et al. A novel rabbit model of mild, reproducible disc degeneration by an annulus needle puncture: correlation between the degree of disc injury and radiological and histological appearances of disc degeneration [J]. *Spine*, 2005,30:5-14.
- [17] SOBAJIMA S, SHIMER A L, CHADDERDON R C, et al. Quantitative analysis of gene expression in a rabbit model of intervertebral disc degeneration by real-time polymerase chain reaction [J]. *Spine J*, 2005,5:14-23.
- [18] MASUDA K, IMAI Y, OKUMA M, et al. Osteogenic protein-1 injection into a degenerated disc induces the restoration of disc height and structural changes in the rabbit annular puncture model [J]. *Spine*, 2006,31:742-754.
- [19] AOKI Y, OHTORI S, TAKAHASHI K, et al. Innervation of the lumbar intervertebral disc by nerve growth factor-dependent neurons related to inflammatory pain [J]. *Spine*, 2004, 29: 1077-1081.
- [20] STRATA P, BUFFO A, ROSSI F. Mechanisms of axonal plasticity [J]. *Arch Ital Biol*, 1999, 137:181-192.
- [21] MELROSE J, ROBERTS S, SMITH S, et al. Increased nerve and blood vessel ingrowth associated with proteoglycan depletion in an ovine annular lesion model of experimental disc degeneration [J]. *Spine*, 2002,27:1278-1285.
- [22] AOKI Y, OHTORI S, INO H, et al. Disc inflammation potentially promotes axonal regeneration of dorsal root ganglion neurons innervating lumbar intervertebral disc in rats [J]. *Spine*, 2004,29:2621-2626.

[责任编辑 黄晓花]

我校医学院附属妇产科医院一项技术获得国家发明专利

浙江大学申报的一项以徐晨明博士和黄荷凤教授为技术发明人的“一种单个卵裂球的染色体制备方法”国家发明专利近期获得授权。这项基于克隆技术的染色体检测方法,在染色体病的植入前遗传学诊断(PGD)领域有着诱人的应用前景。

传统的染色体病PGD主要依赖于间期核荧光原位杂交,但仅能提供有限的染色体区域信息,不能检查所有的染色体异常类型。本授权专利是利用克隆技术,将活检的卵裂球与去核的动物卵子融合,利用动物的卵浆因子,诱导人处于间期的卵裂球进入有丝分裂中期,再结合全染色体涂抹探针的FISH技术和G显带核型分析,可将染色体病的诊断范围扩大到所有的异常类型。专利授权后,相关临床可行性研究和应用工作仍在继续。

该专利为黄荷凤教授主持的“胚胎着床前遗传学诊断”课题组的成果之一。近年来,出生缺陷率的上升引起了政府的高度重视,“出生缺陷防治”已列为国家长期规划中的一个重点领域和优先主题。植入前遗传学诊断可在源头上控制遗传病的发生,作为预防出生缺陷的一级措施,受到广泛的关注。该院相关研究已得到浙江省重大科技专项和国家“863”等项目的支持,并在单基因病和染色体病的出生缺陷控制方面取得了一定的成效。